

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. Juni 2001 (07.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/40300 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/47,  
C12N 15/12, 15/63, A61K 38/17

(AT). DURO, Dominique [—/DK]; Brunnage NDR, Fry-  
havensgate 88, 4th, DK-2100 Kopenhagen (DK).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/04257

(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Truderinger Strasse  
246, 81825 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
29. November 2000 (29.11.2000)

(81) Bestimmungsstaat (national): US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 57 689.0 30. November 1999 (30.11.1999) DE

Veröffentlicht:  
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZEN-  
TRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS  
[DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg  
(DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JANSEN-DÜRR, Pid-  
der [DE/AT]; Schneebergasse 76 A, A-6020 Innsbruck

(54) Title: PROTEASE RESISTANT TUMOR SUPPRESSOR P14(ARF)

(54) Bezeichnung: PROTEASE-RESISTENTER TUMORSUPPRESSOR P14(ARF)

(57) Abstract: The invention relates to a variant of p14 (ARF) tumor suppressor which exhibits resistance to proteolytic degradation. The invention also relates to a nucleic acid molecule which codes for this variant. Also disclosed are peptides preventing proteolytic degradation of p14 (ARF) by binding to p14 (ARF) and nucleic acid molecules which code for said peptide. Vectors containing said nucleic acid molecules are further disclosed whereby said vectors are suitable for use in the gene therapy of tumors. Medicaments are also disclosed containing the aforementioned nucleic acid molecules or vectors or proteins or peptides coded thereby for the treatment of leukemia.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird eine Variante des Tumorsuppressors p14(ARF), die eine Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau aufweist, sowie ein diese Variante codierendes Nucleinsäuremolekül. Beschrieben werden ferner Peptide, die durch Bindung an p14(ARF) dessen proteolytischen Abbau verhindern und diese Peptide codierende Nucleinsäuremoleküle. Ausserdem werden diese Nucleinsäuremoleküle enthaltende Vektoren beschrieben, die beispielsweise zur Gentherapie von Tumoren geeignet sind. Schliesslich werden Arzneimittel beschrieben, die die vorstehenden Nucleinsäuremoleküle bzw. Vektoren enthalten oder die davon codierten Proteine bzw. Peptide, vorzugsweise zur Behandlung von Leukämie.

WO 01/40300 A2

### **Protease-resistenter Tumorsuppressor p14(ARF)**

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Nucleinsäuremoleküle, die für ein Protein mit der biologischen Aktivität des Tumorsuppressors p14(ARF) codieren und dadurch gekennzeichnet sind, daß die Nucleinsäuresequenz des Nucleinsäuremoleküls gegenüber der das native p14(ARF) codierenden Sequenz mindestens eine Mutation aufweist, die zu einer Resistenz der davon codierten p14(ARF)-Variante gegenüber proteolytischem Abbau führt. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die Peptide codieren, die durch Bindung an p14(ARF) dessen proteolytischen Abbau verhindern. Die vorliegende Erfindung stellt ferner die vorstehende p14(ARF)-Variante und Peptide sowie die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthaltende Vektoren bereit, wobei diese beispielsweise zur Gentherapie geeignet sind.

Die Umwandlung von normalen Zellen zu Krebszellen vollzieht sich in mehreren Teilschritten, bei denen es zur Mutation zellulärer Gene (Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene) oder zum Erwerb viraler Onkogene kommt. Krebsrelevante Veränderungen sind die Aktivierung von Proto-Onkogenen durch Mutationen, Genamplifikation, Überexpression oder Chromosomen-Translokationen, sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Mutationen, beispielsweise Deletionen. Bezüglich der Prävention bzw. der Behandlung von Krebs erwiesen sich die Tumorsuppressorgene als besonders interessant, da diese offensichtlich neue Möglichkeiten in der Krebstherapie bieten und darüber hinaus deren Studium ein besseres Verständnis für die molekularen Mechanismen der Krebsentwicklung erlauben.

Als wichtiges Beispiel für ein Tumorsuppressorgen sei p53 genannt, das einen Transkriptionsfaktor p53 codiert, dessen Inaktivierung zur Entwicklung des Li-Fraumeni-Syndroms führt, und das sich bei der Analyse von menschlichen Tumoren als

eines der am häufigsten mutierten Tumorsuppressorgene herausgestellt hat (siehe beispielsweise Hollstein et al., Science 253 (1991), 49-53). Zwei weitere Tumorsuppressoren sind p16(INK4A) (Serrano et al., Nature 366 (1993), 704-707) und p14/p19(ARF) (Quelle et al., Cell 83 (1995), 993-1000; Duro et al., Oncogene 11 (1995), 21-29), die an der Arrestierung des Zellwachstums und an der Tumorsuppression beteiligt sind und von dem Tumorsuppressor-Lokus INK4 codiert werden. p14(ARF) entspricht der humanen Form von p19(ARF). Wie bereits vorstehend diskutiert, ergibt sich aus den bisherigen Untersuchungen, daß Tumorsuppressorgene ein wichtiges Ziel bei der Behandlung von Krebs darstellen, leider konnten allerdings die gewonnenen Erkenntnisse bisher kaum in die Praxis umgesetzt werden und so erfolgt die Krebstherapie bisher im wesentlichen durch zytostatische Behandlungen von Krebspatienten mit oft relativ unspezifischen Zytostatika oder durch Strahlenbehandlung. Leukämien werden in Einzelfällen auch durch Knochenmarkstransplantationen therapiert. Die Behandlung von Tumoren mit Hilfe von Zytostatika oder Strahlenbehandlung hat jedoch erhebliche Nachteile, die auf massiven Nebenwirkungen beruhen, beispielsweise Übelkeit, Haarausfall, Leukopenie, Organschädigungen (insbesondere Leber und Nieren) usw. Knochenmarkstransplantationen sind mit einem großen Aufwand verbunden und auch nur in Einzelfällen möglich, zumal meist das Problem des Auffindens eines geeigneten Spenders besteht.

Somit liegt der Erfindung im wesentlichen das technische Problem zugrunde, Mittel zur Krebstherapie bereitzustellen, die die vorstehend genannten Nachteile der bisherigen Therapieverfahren nicht aufweisen, d.h. vor allem eine gezielte und nebenwirkungsfreie Therapie erlauben.

Die Lösung dieses technischen Problems wurde durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

Es wurde in der vorliegenden Erfindung gefunden, daß das

zelluläre Tumorsuppressor-Protein p19(ARF) bzw. p14(ARF) ein Substrat für das Proteasom darstellt. Desweiteren wurde gefunden, daß die Konzentration dieses Proteins in einer Reihe von verschiedenen Tumorzelllinien äußerst niedrig ist, obwohl die entsprechende mRNA stark exprimiert wird. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die Tumorsuppressor-Funktion von p19(ARF) bzw. p14(ARF) in verschiedenen Tumoren, insbesondere bestimmten Formen der Leukämie, durch proteolytischen Abbau aufgehoben wird. Es konnte gezeigt werden, daß p19(ARF) den Abbau des Oncoproteins MDM2 fördert, was wiederum zu einer beachtlichen Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 führt. Außerdem wurde gefunden, daß p53 die Expression des p14(ARF) codierenden Gens durch Destabilisierung des p14(ARF)-Proteins und vermutlich auch durch Herunterregulation der Transkription erniedrigt. Die Beobachtung, daß das p14(ARF)-Protein durch Proteasom-Inhibitoren selbst in Abwesenheit von funktionalem p53 stabilisiert wird, deutet darauf hin, daß die Konzentration dieses wichtigen Proteins in normalen Zellen durch proteolytischen Abbau reguliert und daran p53 beteiligt ist. Dieser Befund steht mit der Beobachtung in Einklang, daß bestimmte humane Tumorzelllinien und Primärtumore hohe Konzentrationen von p14(ARF)-mRNA exprimieren, das p14(ARF)-Protein jedoch nicht nachweisbar ist. Offensichtlich wird ein komplexes Kontrollsystem, das ein p53/MDM2-Netzwerk umfaßt, zur Aufrechterhaltung einer konstanten Expression von p53 auf niedrigem Niveau benötigt. Dieses Netzwerk reagiert auch auf Signale weiterer Proteine. Insbesondere die Balance zwischen MDM2 und p53 kann durch p14(ARF) dereguliert werden. Dies bindet MDM2, löst dessen proteolytischen Abbau aus und führt somit zu einer Stabilisierung von p53. In der vorliegenden Erfindung wird gezeigt, daß - umgekehrt - p53 das Potential zur Destabilisierung des p14(ARF)-Proteins aufweist. Somit könnte die Kontrolle der Stabilität und Funktion von p14(ARF) durch p53 die Balance zwischen allen drei Partnerproteinen wieder herstellen.

Die Tumorsuppressor-Funktion von p14(ARF) kann durch die erfindungsgemäßen Vorgehensweisen, die somit eine neue

Therapieform darstellen, wiederhergestellt werden. Es kann einerseits eine p14(ARF)-Variante hergestellt werden, die gegen proteolytischen Abbau resistent ist, andererseits können niedermolekulare Peptide hergestellt werden, die an p14(ARF) binden und so dessen Abbau verhindern und somit zu dessen Stabilisierung beitragen. Diese Verbindungen können beispielsweise mittels geeigneter Vektoren in den Tumorzellen exprimiert werden, wodurch das Tumorstadium gestoppt wird und/oder ein programmierter Zelltod (Apoptose) ausgelöst wird, wodurch eine vollständige Elimination des Tumors erreicht werden könnte.

Somit betrifft eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül, das ein Protein mit der biologischen Aktivität des Tumorsuppressors p14(ARF) codiert und dadurch gekennzeichnet ist, daß die Nucleinsäuresequenz des Nucleinsäuremoleküls gegenüber der das native p14(ARF) codierenden Nucleinsäuresequenz mindestens eine Mutation aufweist, die zu einer Resistenz der davon codierten p14(ARF)-Variante gegenüber proteolytischem Abbau führt.

Der hier verwendete Ausdruck "Protein mit der biologischen Aktivität des Tumorsuppressors p14(ARF)" betrifft jedes Protein, das mindestens eine der biologischen Eigenschaften von p14(ARF) bzw. p19(ARF) aufweist, d.h. Tumorsuppressor-Funktion, beispielsweise durch Förderung des Abbaus von MDM2 (Pomerantz et al., Cell 92 (1998), S. 713-723).

Der hier verwendete Ausdruck "p14(ARF)-Variante" betrifft jede Form von p14(ARF), die gegenüber der nativen Form so verändert ist, daß sie gegenüber proteolytischem Abbau resistent ist. Dies wird vorzugsweise dadurch erreicht, daß Aminosäure-Motive, die Erkennungsstellen für Proteasen darstellen, so verändert werden, daß diese einerseits von den Proteasen nicht mehr erkannt werden, andererseits die biologische Aktivität des Proteins im wesentlichen erhalten bleibt. Dies läßt sich durch die gezielte Einfügung von Punktmutationen in die p14ARF cDNA (Duro et al., Oncogene 11 (1995), S. 21-29; s. Fig. 2)

mittels der Polymerase-Kettenreaktion durchführen. Hierbei kann durch die Wahl geeigneter Oligonukleotide (Primer) mit einem oder mehreren gegenüber der Wildtyp-Sequenz veränderten Nukleotiden eine beliebige Mutation der Aminosäuresequenz des resultierenden p14ARF-Proteins gezielt erzeugt werden. Diese Mutationen werden bevorzugt Aminosäuren im N-Terminus von pARF14 betreffen, da N-terminale Sequenzen für die Proteinstabilität von entscheidender Bedeutung sind. Jedoch sind auch andere Mutationen des Proteins denkbar, die zu einer Resistenz gegenüber dem proteasomalen Abbau führen.

Die erfindungsgemäße p14(ARF)-Variante kann neben diesen Veränderungen gegenüber der nativen Form noch weitere Veränderungen aufweisen, d.h. gegenüber der nativen Form Deletionen, Additionen oder Austausche von einer oder mehreren Aminosäuren und/oder (eine) modifizierte Aminosäure(n) aufweisen oder veränderte Oligosaccharidseitenketten, wobei ihre biologische Aktivität im wesentlichen erhalten bleibt, d.h. sie weist beispielsweise die in den nachstehenden Beispielen beschriebenen Eigenschaften auf. Zu den Austauschen zählen vorzugsweise "konservative" Austausche von Aminosäureresten, d.h. Austausche gegen biologisch ähnliche Reste, z.B. die Substitution eines hydrophoben Rests (z.B. Isoleucin, Valin, Leucin, Methionin) gegen einen anderen hydrophoben Rest, oder die Substitution eines polaren Rests gegen einen anderen polaren Rest (z.B. Arginin gegen Lysin, Glutaminsäure gegen Asparaginsäure etc.). Deletionen können zur Erzeugung von Molekülen führen, die eine deutlich geringere Größe aufweisen (Fragmente), d.h., denen beispielsweise Aminosäuren am N- oder C-Terminus fehlen. Die vorstehenden Varianten betreffen auch p14(ARF)-Varianten, die im Vergleich zu der ursprünglichen Form eine ähnliche oder bessere biologische Aktivität aufweisen. Diese biologische Aktivität kann mittels der in den nachstehenden Beispielen beschriebenen Verfahren untersucht werden. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Aminosäuresequenz bzw. entsprechenden Nucleinsäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie

beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989). Der Fachmann ist auch in der Lage zu bestimmen, ob eine von einer so veränderten Nucleinsäuresequenz codierte p14(ARF)-Variante noch über die biologische Aktivität eines Tumorsuppressors verfügt.

Der hier verwendete Ausdruck "Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau" bezeichnet die durch mindestens eine Aminosäureänderung erzielte Resistenz, die sich auf die wirksamste(n) Protease(n), vorzugsweise alle Proteasen des Proteasoms bezieht, z.B. Serin/Threonin- und Cysteinproteasen sowie Metalloproteasen und saure Proteasen (Goldberg, Science 268 (1995), S. 522-523), bzw. zu einer p14(ARF)-Variante führt, die deren Vorhandensein in der Zelle in einer Konzentration gestattet, daß sie noch Tumorsuppressorfunktion ausüben kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül außerdem dadurch gekennzeichnet, daß die davon codierte p14(ARF)-Variante hinsichtlich ihrer Interaktion mit p53 nicht wesentlich beeinträchtigt ist

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Nucleinsäuremolekül, das ein Peptid(aptamer) codiert, das so an p14(ARF) bindet, daß dessen proteolytischer Abbau verhindert, die Interaktion mit p53 jedoch nicht wesentlich beeinträchtigt ist. Mittels solcher Peptide ist es ebenfalls möglich, den proteolytischen Abbau von p14(ARF) zu verhindern. Der Fachmann ist in der Lage, solche Peptidaptamere bzw. Peptide gemäß üblicher Verfahren, beispielsweise den in dem nachstehenden Beispiel 5 beschriebenen Verfahren zu entwerfen und deren Funktion zu überprüfen. Derartige Peptide bzw. Peptidaptamere haben üblicherweise eine Länge von etwa 20 Aminosäuren. Es können jedoch auch kürzere oder längere Fragmente in dem jeweiligen System aktiv sein. Peptidaptamere,

die die gewünschten Eigenschaften aufweisen, können dann als "lead compounds" zur Ableitung geeigneter Wirkstoffe, d.h. synthetischer Peptide verwendet werden, die beispielsweise im Wesentlichen die gleiche Aminosäuresequenz wie das Peptidaptamer umfassen, aber durch Modifikationen gegen proteolytischen Abbau geschützt sind. Die Verfahren zur Herstellung von Peptiden sind dem Fachmann bekannt (z.B. mittels Merryfield-Synthese). Die wichtigste Modifikation zum Schutz von Peptiden vor dem Abbau durch zelluläre Proteasen liegt in dem Anhängen von Zucker-Seitenketten an einzelne Aminosäuren (N- oder O-Glykosylierungen).

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können auch in einen Vektor inseriert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch diese Nucleinsäuremoleküle enthaltende Vektoren. Die Bezeichnung "Vektor" bezieht sich auf ein Plasmid (z.B. pUC18, pBR322, pBlueScript), auf ein Virus oder ein anderes geeignetes Vehikel. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Prokaryonten, beispielsweise E.coli, zählen der lac-, trp-Promotor oder T7-Promotor, und für die Expression in Eukaryonten der AOX1- oder GAL1-Promotor in Hefe, und der CMV-, SV40-, RVS-40-Promotor, CMV- oder SV40-Enhancer für die Expression in tierischen Zellen. Weitere Beispiele für geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor. Zu geeigneten Vektoren zählen beispielsweise auf T7 basierende Expressionsvektoren für die Expression in Bakterien (Rosenberg et al., Gene 56 (1987), 125, pMSXND für die Expression in Säugerzellen (Lee und Nathans, J.Biol.Chem. 263 (1988), 3521, und von Baculovirus abgeleitete Vektoren für die Expression in Insektenzellen.



In einer bevorzugten Ausführungsform liegt die erfindungsgemäße Nucleinsäuresequenz so in dem Vektor vor, daß ein Fusionsprotein codiert wird, die eine p14(ARF)-Variante oder das vorstehend beschriebene Peptid(aptamer) und eine Penetrationssequenz, die die Aufnahme in die gewünschte Zielzelle erleichtert. Solche Penetrationssequenzen können beispielsweise von dem Antennapedia-Protein von Drosophila (das das sog. "penetratin"-Motiv enthält) (Fahraeus et al., Current Biology 6 (1996), S. 84-91) oder dem TAT-Protein von HIV-1 (Vives et al., J.Biol.Chem. 272 (1997), 16010-16017) abgeleitet sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform stammt der die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthaltende Vektor von einem Virus, beispielsweise von einem adenoassoziierten Virus (beispielsweise AAV Typ 2), Vaccinia-Virus oder Adenovirus, der bei einer Gentherapie von Nutzen ist. Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV. Verfahren zur Herstellung geeigneter, auf den vorstehenden Viren basierenden Vektoren sind dem Fachmann bekannt (z.B. Qiao et al., Cancer Gene Ther. 6 (1999), S. 373-379; Bueler et al., Biol. Chem. 380 (1999), S. 613-622). Für Zwecke der Gentherapie können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle auch in Form von kolloidalen Dispersionen zu den Zielzellen transportiert werden. Dazu zählen beispielsweise Liposomen oder Lipoplexe (Mannino et al., Biotechniques 6 (1988), 682). Die vorstehenden Vektoren können beispielsweise auch zur ex vivo-Gentherapie verwendet werden, beispielsweise bei Blutzellen von Patienten mit Leukämie.

Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in

Sambrook et al., supra, beschrieben sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend beschriebenen Vektoren enthaltende Wirtszellen. Zu diesen Wirtszellen zählen Bakterien, Hefe, Insekten- und Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus die von den vorstehenden Nucleinsäuremolekülen bzw. diese enthaltenden Vektoren codierte p14(ARF)-Variante bzw. das zu dessen Stabilisierung vor proteolytischen Abbau nützliche Peptid(apramer), wobei diese Verbindungen vorzugsweise mindestens eine (weitere) Modifikation tragen, die in der Zelle vor proteolytischem Abbau schützt. Solche Modifikationen sind dem Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise die vorstehend beschriebenen Modifikationen. Die wichtigsten Modifikationen zum Schutz von Peptiden vor dem Abbau durch zelluläre Proteasen liegt in dem Anhängen von Zucker-Seitenketten an einzelne Aminosäuren (N- oder O-Glykosylierungen). Einen Schutz vor dem proteasomalen Abbau von p14ARF bietet vorzugsweise eine gezielte Mutation des N-Terminus, da dieser für die Proteinstabilität von entscheidender Bedeutung ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der p14(ARF)-Variante oder des Peptids, umfassend die Kultivierung der vorstehend beschriebenen Wirtszellen unter Bedingungen, die die Expression des Proteins bzw. Peptids erlauben (vorzugsweise stabile Expression), und Gewinnung des Proteins bzw. Peptids aus der Kultur. Geeignete Verfahren zur rekombinanten Herstellung des Proteins bzw. Peptids sind allgemein bekannt (siehe beispielsweise Holmgren, Annu.Rev.Biochem. 54 (1985), 237; LaVallie et al., Bio/Technology 11 (1993), 187; Wong, Curr.Opin.Biotech. 6

(1995), 517; Romanos, Curr.Opin.Biotech.6 (1995), 527; Williams et al., Curr. Opin. Biotech.6 (1995), 538; und Davies, Curr. Opin.Biotech.6 (1995), 543). Auch geeignete Reinigungsverfahren (beispielsweise präparative Chromatographie, Affinitätschromatographie, beispielsweise Immunoaffinitäts-chromatographie, HPLC etc.) sind allgemein bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Arzneimittel, die die vorstehend beschriebenen Nucleinsäuren, Vektoren, Proteine bzw. Peptide enthalten. Diese Arzneimittel enthalten gegebenenfalls zusätzlich einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Die Verabreichung der Arzneimittel kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle (z.B. direkt zu dem Tumor), intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale oder intranasale Verabreichung. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, dem Stadium eines Tumors, der Art der Verabreichung etc..

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Arzneimittel zur Prävention oder Behandlung von Krebserkrankungen verwendet. Dazu zählen beispielsweise Leukämie, Melanome, Gliome und Tumoren der Blase. Besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße Arzneimittel zur Behandlung von Leukämie verwendet. Dabei kann das Arzneimittel in der Gentherapie Verwendung finden, wobei die vorstehend beschriebenen Verfahren bzw. Vektoren zur Einschleusung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren Anwendung finden können. Andererseits kann das von den erfindungsgemäßen

Nucleinsäuremolekülen codierte Protein bzw. Peptid direkt verabreicht werden, um so in Zellen, die keine ausreichende Konzentration von p14(ARF) aufweisen, Tumorsuppressoraktivität wiederherzustellen. Das erfindungsgemäße Arzneimittel kommt bevorzugt dann zur Anwendung, wenn geeignete diagnostische Verfahren, beispielsweise Verfahren, die auf den in den nachstehenden Beispielen beschriebenen Analysen beruhen, den Nachweis darüber liefern, daß in dem betreffenden Patienten biologisch aktives p14(ARF) nicht oder in zu geringen Mengen vorhanden ist.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls, Vektors, Proteins oder Peptids zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prävention einer Krebserkrankung, wobei es sich vorzugsweise um Leukämie handelt.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben, welche zeigen:

**Figur 1:**

Die in der Figur 1 verwendete Bezeichnung "Hp19 ARF" ist gleichbedeutend mit p14(ARF), d.h. stellt das menschliche Homologe des üblicherweise mit p19 (ARF) bezeichneten Mausproteins dar.

**(A) p53 reduziert die Konzentration an endogenem p14(ARF)-Protein in SAOS-2-Zellen**

SAOS-Zellen und der p53 exprimierende Subclon X4-4 wurden wie angegeben bei 32°C bzw. 37°C gezüchtet. Metabolische Markierung und Immunpräzipitation wurden wie in DellaValle et al., Oncogene 15 (1996), 2949-2959, beschrieben unter Verwendung von Kaninchen-anti-p14(ARF)-Antiserum oder dem Pre-Immunserum wie angegeben durchgeführt.

**(B,C) Stabilisierung von p14(ARF) durch den Proteasom-Inhibitor N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (LLnL)**

(B) C33A-Zellen wurden mit einem unter Kontrolle des CMV-Promotors stehenden Expressionsvektors für p14(ARF) transfiziert und 12 Stunden mit dem jeweils angegebenen Protease-Inhibitor (50  $\mu$ M) inkubiert. Als Kontrolle wurde außerdem nicht-transfizierte Zellen und mit p14(ARF) transfizierte Zellen, die entweder unbehandelt (NT) oder mit DMSO behandelt worden waren, verwendet. Immunoblots wurden wie in DellaValle et al., Oncogene 15 (1996), 2949-2959, beschrieben unter Verwendung von Kaninchen-anti-p14(ARF)-Antiserum und des monoclonalen anti-p53-Antikörpers DO-1 (Fa. Santa Cruz, Heidelberg) durchgeführt. Der untere Abschnitt der Figur zeigt eine längere Belichtung des p14(ARF)-Immunoblots.

(C) Mit p14(ARF) transfizierte C33A-Zellen wurden 12 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (LLnL; Fa. Sigma, Deisenhofen) wie angegeben behandelt und wie in (B) analysiert.

**(D) Der Verlust an p14(ARF) wird durch p53 stimuliert**

C33A-Zellen wurden mit einem p14(ARF)-Expressionsvektor und unterschiedlichen Mengen eines p53-Expressionsvektors gemeinsam transfiziert. Die Zellextrakte wurden mittels Immunoblots hinsichtlich p14(ARF) und p53 wie in (B) analysiert. Das Verhältnis zwischen beiden Expressionsvektoren variierte von 1:1 bis 1:60.

**(E) p53-abhängige Destabilisierung von p14(ARF) wird durch den Proteasom-Inhibitor LLnL gehemmt**

C33A-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für p14(ARF) und p53 im Verhältnis 1:1 transfiziert, mit DMSO oder 50  $\mu$ M der angegebenen Protease-Inhibitoren behandelt und mittels Western-Blot wie in (B) analysiert.

**(F) Modell für die regulatorische Interaktion zwischen p14(ARF), p53 und MDM2**

Wie bereits früher gezeigt (Levine, Cell 88 (1997), 323-331) induziert p53 die Expression des MDM2-Gens und MDM2 löst den Abbau von p53 durch das Proteasom aus, während p14(ARF) die

Destabilisierung von p53 durch MDM2 hemmt (schwarze Linien) (Pomerantz et al., Cell 92 (1998), 3926-3931). In der vorliegenden Erfindung wird gezeigt, daß p53 auch p14(ARF) herunterreguliert (gestrichelte Linie)

**Fig. 2:** (a) DNA-Sequenz von p14/19(ARF)  
(b) Aminosäuresequenz von p14/19(ARF)

Die nachstehenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung.

### Beispiel 1

#### Allgemeine Verfahren

##### Zelllinien:

Die Zelllinien U-2OS (ATCC, Rockville, Md, Nummer: HTB 96), Saos-2 (ATCC, Rockville, Md., Nummer: HTB 85) und die durch Transfektion der *Xenopus laevis* p53 cDNA (Bessard et al., Oncogene 16, (1998), S. 883-890) in Saos-2 hergestellte Zelllinie X4-4 wurden in Dubecco's Modified Eagle Medium, supplementiert mit 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin und 10% fötalem Kälberserum (FCS), kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in beschichteten Zellkulturschalen oder Flaschen in einem Brutschrank bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung. Die Zellen wurden alle zwei Tage passagiert.

##### Expressionsplasmide:

Die Herstellung der Expressionsplasmide für p14ARF erfolgte durch Insertion der cDNA von p14ARF in den CMV-Promotor-getriebenen Vektor pX (Pagano et al., EMBO J. 11, S. 961-971 (1992)). Die Herstellung der Hefevektoren für die Expression der Peptid-Aptamerbank erfolgte durch Insertion dieser Bank in das Plasmid pJM-1 (Colas et al., Nature 380 (1996), S. 548-550).

##### Transfektion der Zellen:

Die Transfektion der Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Chen und Okayama (Mol. Cell Biol. 7, S. 2745-2752 (1987))

durch Calcium-Phosphat-Präzipitation. Etwa  $10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  Fläche der Kulturschale wurden in Kulturmedium D-MEM ausplattiert und mindestens 4 Std. im Brutschrank inkubiert, um eine Anheftung der Zellen zu ermöglichen. 1-2  $\mu\text{g}$  DNA pro ml Medium wurden mit 50  $\mu\text{l}$  einer 0,25 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt und nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  2x BBS-Lösung 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden für etwa 16 Std. bei  $35^\circ\text{C}$  und 3%  $\text{CO}_2$ -Begasung inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate durch zweimaliges Waschen mit Medium entfernt, neues Medium zugesetzt und die Zellen für weitere 8 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Begasung inkubiert, um transfizierte Gene zu exprimieren.

#### Immunpräzipitation:

Zellen wurden durch die Zugabe von IP-Puffer (50 mM HEPES-NaOH, pH 7,0; 150 mM NaCl, 0,2 mM PMSF, 0,1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 10  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, 1 mM NaF, 0,1 % NP40) lysiert. Die Lysate wurden zunächst mit 50  $\mu\text{l}$  in IP-Puffer äquilibrierter Protein-A- bzw. Protein-G-Agarose für 1 Std. bei  $4^\circ\text{C}$  vorgereinigt. Für die Immunpräzipitation wurden 0,2-1  $\mu\text{g}$  gereinigte IgG-Fraktion bzw. 1  $\mu\text{l}$  polyklonales Antiserum sowie 50  $\mu\text{l}$  äquilibrierte Protein-A-Agarose bzw. Protein-G-Agarose zugegeben und für 3 Std. bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Protein-Antikörper-Komplexe wurden vier Mal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen und durch Western-Blot detektiert.

### Beispiel 2

#### p53 reguliert den p14(ARF)-Spiegel

Die Effekte von p53 auf die Expression des p14(ARF)-Gens wurden mit dem p53-Gen aus *Xenopus laevis* (Xl-p53) untersucht, wobei sich Xl-p53 als eine temperatursensitive Mutante von p53 verhält (Bessard et al., *Oncogene* 16 (1998), 883-890). p53-defiziente SAOS-2-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für Xl-p53 (Bessard et al., *Oncogene* 16 (1998), S. 883-890)

stabil transfiziert, wobei die Zelllinie X4-4 erhalten wurde. SAOS-2- und X4-4-Zellen wurden bei 37°C gezüchtet. Bei dieser Temperatur ist X1-p53 inaktiv. Nach metabolischer Markierung (durch Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin und Cystein zu dem Zellkulturmedium für 30 Min.) wurde p14 aus zellulären Extrakten immunpräzipitiert. Unter diesen Bedingungen konnte die Expression von humanem p14(ARF) sowohl in SAOS-2- als auch X4-4-Zellen leicht nachgewiesen werden (Figur 1A). Nach einem Temperaturshift auf 32°C, was zur vollständigen Aktivität von X1-p53 führt, konnte eine starke Verringerung des p14(ARF)-Signals in X4-4-Zellen beobachtet werden, während in den parenteralen SAOS-2-Zellen nur eine marginale Verringerung beobachtet werden konnte (Figur 1A). Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Aktivierung der Funktion von p53 in X4-4-Zellen die Expression von endogenem humanem p14(ARF) herunterreguliert.

### Beispiel 3

#### **p53 löst den proteolytischen Abbau von p14(ARF) durch das Proteasom aus**

Die Induktion von p53 führt zu einer deutlichen Verringerung der Menge an p14(ARF)-mRNA, was durch Northern-Analysen gezeigt werden konnte. Diese Befunde stehen mit einer transkriptionellen Regulation des p14(ARF)-Gens durch p53 in Einklang. Das Ausmaß der Herunterregulation, die für das p14(ARF)-Protein beobachtet werden konnte, übersteigt jedoch die Herunterregulation der Transkription des p14(ARF)-Gens bei weitem. Deshalb wird davon ausgegangen, daß p53 u.U. den p14(ARF)-Spiegel auch auf dem post-transkriptionellen Niveau beeinflusst. Da das MDM2-Protein, das sowohl p53 als auch p14(ARF) bindet, die Aktivität einer spezifischen Ubiquitin-Ligase aufweist (Honda et al., FEBS Lett. 420 (1997), 25-27), wird angenommen, daß p14(ARF) selbst einem Abbau durch das Proteasom unterliegt. U-2OS-Zellen (ATCC, Rockville, Md.) wurden mit einem Expressionsvektor für p14(ARF) unter Kontrolle des CMV-Promotors (der den direkten Nachweis des



transfizierten Proteins durch Western-Blot erlaubt; siehe Figur 1B, Spur 2) transient infiziert und während des Transfektionsexperiments mit dem Protease-Inhibitor LLnL inkubiert. Es ergab sich eine signifikante Zunahme an transfiziertem p14(ARF)-Protein, während die nicht-verwandten Protease-Inhibitoren LLM und E46 keinen Effekt hatten. Die Stabilisierung von p14(ARF) hängt von der verwendeten LLnL-Dosis ab (Figur 1C). Dieser Befund weist darauf hin, daß in U-2OS-Zellen p14(ARF) einem Abbau durch das Proteasom unterliegt. Dabei führt die Behandlung mit LLnL zu einem signifikanten Verlust an p14(ARF)-Protein sowohl in p14(ARF) exprimierenden als auch nicht-transfizierten U-2OS-Zellen (Figur 1B). Die gemeinsame Expression von p53 mit p14(ARF) in U-2OS-Zellen führt zu einer Dosis-abhängigen Eliminierung von p14(ARF) (Figur 1D), während der p14(ARF)-mRNA-Spiegel durch p53 nicht beeinflußt wird. Da die Eliminierung des p14(ARF)-Proteins in Gegenwart von p53 durch den Proteasom-Inhibitor LLnL gehemmt werden kann (Figur 1E), kann davon ausgegangen werden, daß p53 den proteolytischen Abbau von p14(ARF) durch das Proteasom auslöst.

#### **Beispiel 4**

##### **Herstellung einer p14(ARF)-Variante, die resistent gegenüber proteolytischem Abbau ist**

Durch gezielte Mutagenese der p14(ARF) codierenden Nucleinsäuresequenz und Charakterisierung der Mutanten im Test hinsichtlich des proteolytischen Abbaus (wie im vorstehenden Beispiel 3 beschrieben) wurde eine Nucleinsäuresequenz isoliert, die eine p14(ARF)-Variante codiert, die resistent gegenüber einem proteolytischen Abbau durch das Proteasom ist, jedoch noch p53 stabilisieren kann. Hierzu wurden Punktmutationen in dem für den N-Terminus kodierenden Abschnitt der p14ARF-cDNA (Duro et al., Oncogene 11 (1995), S. 21-29) mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingefügt. Diese PCR wurde mit Primer-Oligonukleotiden durchgeführt, welche jeweils in einem Nukleotid von der Wildtyp-Sequenz

abwichen. Dieses Verfahren der gezielten Mutagenese ist dem Fachmann hinreichend bekannt. Die weiterhin bestehende Fähigkeit zur Interaktion des mutierten p14ARF-Moleküls mit MDM-2 wurde durch die Präzipitation von MDM-2 mit einem GST-p14ARF-Fusionsprotein nachgewiesen; die Resistenz gegenüber dem proteolytischen Abbau wurde durch ein vergleichendes Transfektionsexperiment mit entweder Wildtyp-p14ARF oder mutiertem p14ARF in p53-positiven Zellen nachgewiesen. Diese wurden dann durch Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin und Cystein metabolisch markiert. Die in einem definierten Zeitraum (30 Min.) synthetisierten Protein wurden nach Immunpräzipitation und elektrophoretischer Auftrennung durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Eine größere Menge von verbliebenem mutiertem p14ARF-Protein im Vergleich zu dem Wildtyp-p14ARF zeigte eine erhöhte Resistenz gegen den proteolytischen Abbau.

#### **Beispiel 5**

##### **Herstellung von Peptidaptameren, die durch spezifische Bindung an das p14(ARF)-Protein dessen proteolytischen Abbau verhindern**

Es werden Peptidaptamere entwickelt, die an das p14(ARF)-Protein so spezifisch binden können, daß der proteolytische Abbau verhindert wird, wobei jedoch die Interaktion mit dem p53-Protein nicht gestört wird. Dazu wird die p14(ARF)-cDNA (Duro et al., Oncogene 11 (1995), S. 21-29) in den Hefe-Expressionsvektor pEG202 (Gyuris et al., Cell 75 (1993), S. 791-803) kloniert, der es erlaubt, in Hefezellen unter Verwendung des sogenannten "two hybrid"-Systems (Gyuris et al., Cell 75 (1993), S. 791-803) diejenigen Peptide aus einer Peptidbank mit zufallsgenerierten Sequenzen (Colas et al., Nature 380 (1996), S. 548-550) zu isolieren, die mit hoher Affinität an p14(ARF) binden. Diese Peptidaptamere bestehen üblicherweise aus etwa 20 Aminosäuren, die im Rahmen des bakteriellen Thioredoxin A Proteins (TrxA) exprimiert werden. Es sind aber auch kürzere oder längere Peptide möglich, ebenso kann die Expression auch im Rahmen eines anderen

"Gerüstproteins" als TrxA erfolgen. Die Interaktion eines solchen Peptids mit dem p14ARF-Protein wird in dem "Two-Hybrid-System" dadurch identifiziert, daß nur in den Hefezellen, in denen eine solche Interaktion stattfindet, ein Reportergen exprimiert wird, das es den Zellen erlaubt, auf Nährböden zu wachsen, denen eine essentielle Aminosäure fehlt. Diese Peptidaptamere codierenden DNA-Sequenzen werden dann in einen Expressionsvektor für Säuger unter Kontrolle eines CMV-Promotors, z.B. pCDNA3, pCI oder ähnliche, cloniert und in Säugerzellen, z.B. U-2OS, zusammen mit dem p14(ARF)-Protein exprimiert. Durch eine Western-Blot-Analyse mit Extrakten von transfizierten Zellen kann der Einfluß bestimmter Peptidaptamere auf die metabolische Stabilität des p14(ARF)-Proteins untersucht werden. Es werden Peptidaptamere gesucht, die den proteolytischen Abbau von p14(ARF) hemmen, jedoch nicht dessen Interaktion mit p53 stören. Die p53-Bindung wird durch gemeinsame Expression eines p53-Expressionsvektors und anschließende Immunpräzipitation mittels kommerziell erhältlicher anti-p53-Antikörpern untersucht. Falls sich p14ARF in diesen Zellen in einem Komplex mit p53 befindet, so wird es durch die Präzipitation mit anti-p53-Antikörpern kopräzipitiert und kann durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Die Resistenz gegenüber Proteasen wird getestet, indem das p14ARF-Gen entweder allein oder zusammen mit der Sequenz für ein spezifisch bindendes Peptidaptamer in Zellen transfiziert wird. Diese werden dann durch Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin und Cystein metabolisch markiert. Die in einem definiertem Zeitraum (ca. 30 Min.) synthetisierten Proteine können nach Immunpräzipitation und elektrophoretischer Auftrennung durch Autoradiografie sichtbar gemacht werden. Eine größere Menge von verbliebenem p14ARF-Protein in der Gegenwart eines Peptidaptamers im Vergleich zu dem in Kontrollzellen exprimierten weist auf eine erhöhte Resistenz gegenüber dem proteolytischen Abbau hin.

### Patentansprüche

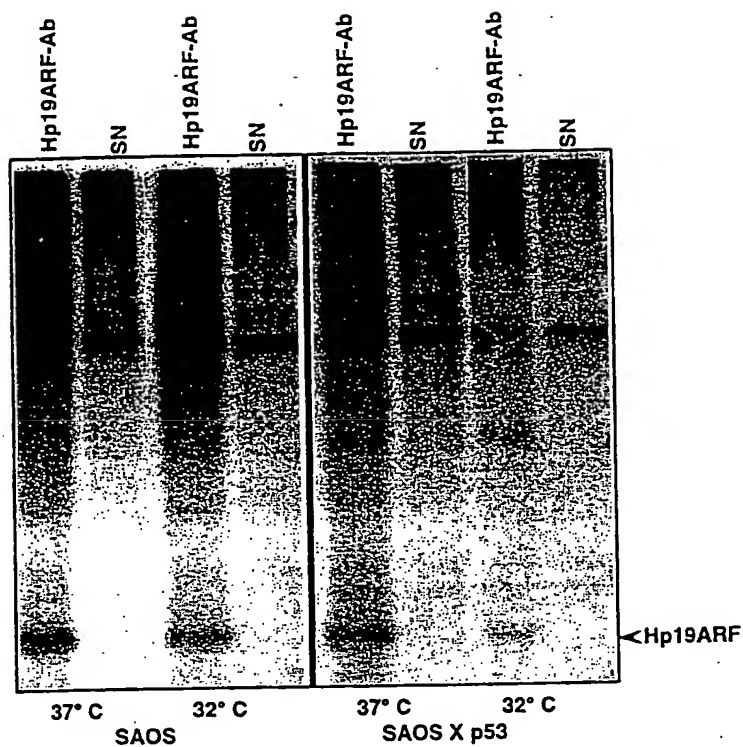
1. Nucleinsäuremolekül, das ein Protein mit der biologischen Aktivität des Tumorsuppressors p14(ARF) codiert, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäuresequenz des Nucleinsäuremoleküls gegenüber der das native p14(ARF) codierenden Nucleinsäuresequenz mindestens eine Mutation aufweist, die zu einer Resistenz der davon codierten p14(ARF)-Variante gegenüber proteolytischem Abbau führt.
2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die davon codierte p14(ARF)-Variante hinsichtlich ihrer Interaktion mit p53 nicht wesentlich beeinträchtigt ist.
3. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, das ein Peptid codiert, das so an p14(ARF) bindet, daß dessen proteolytischer Abbau verhindert, die Interaktion mit p53 jedoch nicht wesentlich beeinträchtigt ist.
4. Vektor, ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 enthaltend.
5. Vektor nach Anspruch 4, wobei das Nucleinsäuremolekül mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft ist, die die Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen erlauben.
6. Vektor nach Anspruch 4 oder 5, wobei das Nucleinsäuremolekül ein Fusionsprotein codiert, umfassend das von dem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 codierte Protein bzw. Peptid und eine Penetrationssequenz.
7. Vektor nach einem der Ansprüche 4 bis 6, der von einem RNA-Virus stammt.

8. Vektor nach Anspruch 7, der von einem Retrovirus stammt.
9. Vektor nach einem der Ansprüche 4 bis 6, der von einem Adenovirus oder adenoassoziierten Virus stammt.
10. Wirtszelle, einen Vektor nach einem der Ansprüche 4 bis 9 enthaltend.
11. Wirtszelle nach Anspruch 10, die eine Säugerzelle ist.
12. p14(ARF)-Variante, die von dem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 oder der inserierten Nucleinsäuresequenz des Vektors nach einem der Ansprüche 4 bis 9 codiert wird.
13. Peptid, das von dem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 3 oder der inserierten Nucleinsäuresequenz des Vektors nach einem der Ansprüche 4 bis 9 codiert wird.
14. Verfahren zur Herstellung der p14(ARF)-Variante nach Anspruch 12 oder des Peptids nach Anspruch 13, umfassend die Kultivierung der Wirtszelle nach Anspruch 10 oder 11 unter Bedingungen, die die Expression des Proteins oder Peptids erlauben, und Gewinnung des Proteins oder Peptids aus der Kultur.
15. Protein oder Peptid, das nach dem Verfahren von Anspruch 14 hergestellt wird.
16. Protein oder Peptid nach einem der Ansprüche 12, 13 oder 15, weiter dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine (weitere) Modifikation trägt, die vor proteolytischem Abbau schützt.
17. Arzneimittel, ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, einen Vektor nach einem der Ansprüche 4 bis 9 oder ein Protein bzw. Peptid nach einem der Ansprüche 12, 13, 15 oder 16 oder eine davon abgeleitete

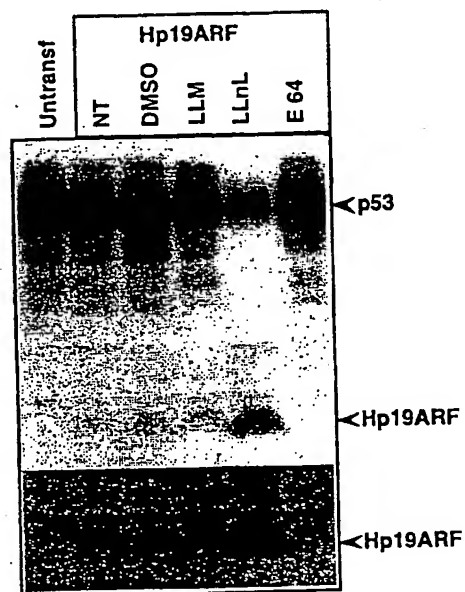
Verbindung enthaltend.

18. Arzneimittel nach Anspruch 17 zur Prävention oder Behandlung einer Krebserkrankung.
19. Arzneimittel nach Anspruch 18 zur Prävention oder Behandlung von Leukämie.

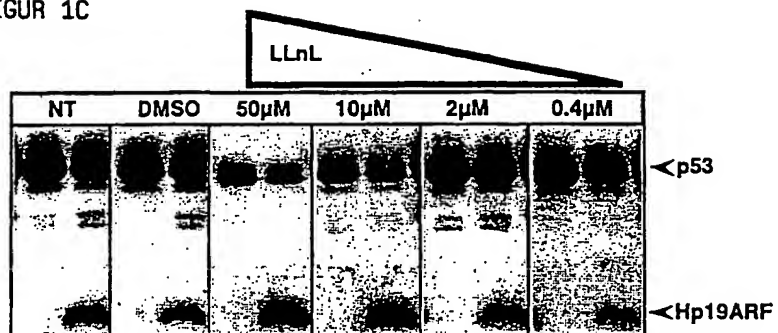
FIGUR 1A



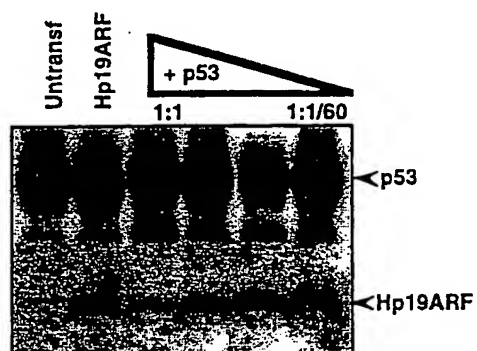
FIGUR 1B



FIGUR 1C



FIGUR 1D



FIGUR 1E

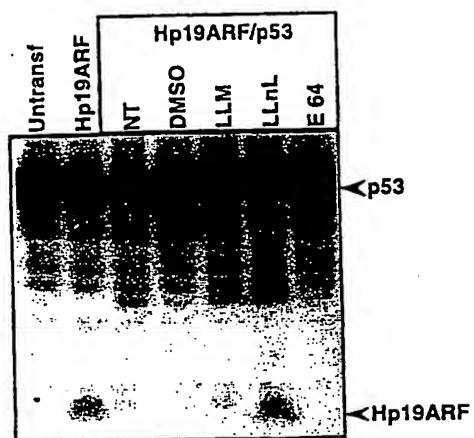
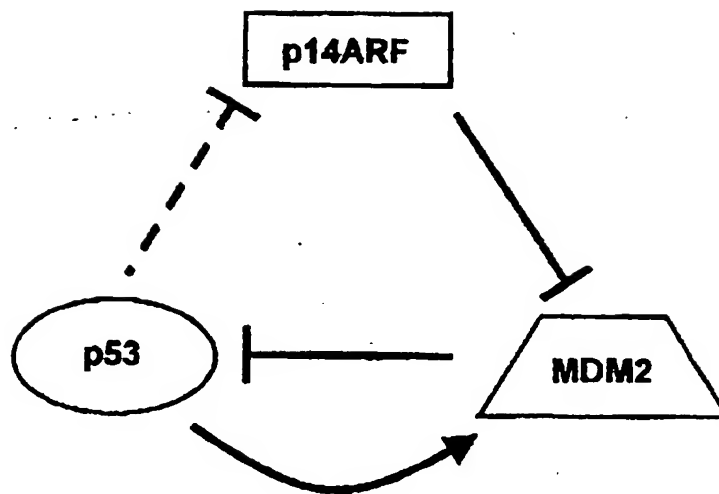




Fig. 1F



FIGUR 2

## a) cDNA-Sequenz von p14ARF:

atggtgcgca ggttcttggt gaccctccgg attcggcgcg cgtgcggccc  
gccgcgagtg agggttttcg tggttcacat cccgcggctc acgggggagt  
gggcagcgcc aggggcgccc gccgctgtgg ccctcgtgcl gatgctactg  
aggagccagc gtctagggca gcagccqctt cctagaagac caggatcatga  
tgatgggcag cggccgagtg gcggagctgc tgctgctcca cggcgcgag  
cccaactgcg ccgaccccgcc cactctcacc cgaccgctgc acgacgctgc  
ccgggagggc ttcttgga caactggtgt gctgcaccgg gccggggcgc  
ggctggacgt gcgcgatgcc tggggccgct tggccgtgga cctggctga

## b) Proteinsequenz von p14ARF:

MVRRFLVTLRIRACGPPRVRFVHHIPRLTGEWAAPGAPAAVALVLMLLRSQRLGQQPLPR  
RPGHDDGQRPSGGAAAAPRRGAQLRRPRHSHPTRARRCPGGLPGHAGGAAPGRGAAGRARCL  
GPSARGPG